AUS DEM HYGIENISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT BASEL
(VORSTEHER: PROF. DOERR)

DER EINFLUSS DER WASSERSTOFFIONENKONZENTRATION AUF DAS LYTISCHE AGENS UND DEN ABLAUF DER ÜBERTRAGBAREN BAKTERIOLYSE.

INAUGURAL-DISSERTATION

DER

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER

UNIVERSITÄT BASEL

VORGELEGT

VON

EDWIN SCHEIDEGGER
AUS BASEL.

VERLAGSBUCHHANDLUNG JULIUS SPRINGER IN BERLIN. 1923

Von der Medizinischen Fakultät genehmigt auf Antrag
von Herrn Professor R. Doerr

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Die vorliegende Arbeit erscheint unter gleichem Titel als „Studien über Bakteriophagen", IV. Mitteilung, in der Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten, Band 99, 4.

Die Mehrzahl der Autoren steht wohl heute auf dem Standpunkte, daß die übertragbare Lyse der Bakterien durch einen kolloidal-dispersen, vermutlich fermentartigen Stoff verursacht oder doch angeregt wird. Die Hypothese *d'Hérelles*, welche dem lytischen Prinzip belebte Natur zuschreibt und im „Bacteriophagum intestinale" einen infravisiblen, obligaten Parasiten bestimmter Mikroben erblickt, erscheint jedoch noch immer nicht definitiv erledigt; nicht nur *d'Hérelle* selbst hält an dieser Konzeption fest, sondern auch andere Forscher wenden sich ihr zu wie z. B. *Prausnitz*, der in den Ergebnissen seiner Filtrationsversuche und in seinen Züchtungen „serumfester" Bakteriophagen[1]) neue, für die Richtigkeit der *d'Hérelle*schen Theorie sprechende Argumente gefunden zu haben glaubt. Manche Experimentatoren nehmen ferner eine vermittelnde Stellung ein, indem sie sich die Bakteriophagen zwar nicht als *organisierte*, wohl aber als *corpusculäre*, im flüssigen Medium *suspendierte* Elemente vorstellen (*Bail*) oder das lytische Prinzip als einen an solchen Partikeln haftenden Stoff auffassen (*Otto* und seine Mitarbeiter), Ideen, welche bekanntlich stets durch das Phänomen der taches vierges begründet werden, dessen Erklärung als unmöglich hingestellt wird, falls man von der Voraussetzung der homogenen Wasserlöslichkeit des lytischen Agens ausgeht.

In diesem Widerstreit der Meinungen spielen natürlich die Untersuchungen über die Wirkung physikalischer und chemischer Faktoren auf das lytische Prinzip eine bedeutsame Rolle, indem sie sich für die Entscheidung über den belebten oder unbelebten Charakter des fraglichen Stoffes mit Vorteil verwenden lassen. Diese Untersuchungen

[1]) *Otto* und *Munter* teilten vor kurzem mit, daß ihnen die Gewinnung serumfester Bakteriophagen trotz mehrfach wiederholter Versuche nicht gelungen sei. Gleiche Mißerfolge hatten *Doerr* und *Zdansky* bei Nachprüfungen im Basler hygienischen Institut zu verzeichnen.

haben in der Tat ergeben, daß die Bakteriophagen mit Eigenschaften ausgestattet sind, welche in dieser Kombination bei keinem mikroskopischen Elementarorganismus und bei keinem invisiblen Virus angetroffen werden. Konnte schon die ursprüngliche Angabe *d'Hérelles*, daß die Bakteriophagen erst bei 65° C allmählich abgetötet werden, Befremden erregen, so wies *Kabéshima* später nach, daß damit die wahre Toleranzgrenze noch nicht erreicht ist, sondern daß die Aktivität des lytischen Prinzips selbst durch mehrmalige Einwirkung von 70° C nicht erheblich leidet. *Gratia, de Necker, Otto* und *Winkler* u. a. machen ähnliche Angaben; im allgemeinen wurde festgestellt, daß die Zerstörung im Intervall zwischen 65 und 75° C stattfindet und daß sich Bakteriophagen verschiedener Herkunft durch ihre Hitzeresistenz nicht unerheblich voneinander unterscheiden können. Sollten sich die jüngsten Mitteilungen von *Hauduroy* bestätigen, so würden die Bakteriophagen bei den genannten Temperaturgraden sogar nur gehemmt (inaktiviert) werden und die völlige Vernichtung würde im flüssigen Milieu erst bei 100—102°, im trockenen Zustande sogar erst bei 135° C erfolgen.

Jahrelange Lagerung, Austrocknung und diffuses Tageslicht scheinen das lytische Prinzip kaum zu schädigen. Es erwies sich widerstandsfähig gegen 1% Phenol, 0,5% Sublimat, 1—2,5% Fluornatrium, 50% Glycerin, gegen Kupfersulfat, bis zu einem gewissen Grade auch gegen Alkohol, Äther, Aceton, Chloroform usw. (*d'Hérelle, Watanabe, Kabéshima, Otto* und *Winkler, Eliava* und *Pozerski, Poorter* und *Maisin, A. G. Kuttner* u. a. m.). Nur Chininsalze machen das lytische Prinzip unwirksam, und zwar schon in relativ niederen Konzentrationen (1 : 100), eine Tatsache, welche *d'Hérelle* als Beweis für seine Ansicht heranzuziehen versuchte; *Wolff* und *Janzen* zeigten aber, daß der Stoff durch Chininverbindungen ebensowenig wie durch Yatren, Trypaflavin, Rivanol oder Malachitgrün endgültig zerstört, sondern nur in eine Art „latenten" Zustandes versetzt wird, aus welchem die aktive Modifikation durch eine einfache Passage mit den lösbaren Bakterien leicht regeneriert werden kann. Auch die Beobachtungen von *Werthemann* über das Verhalten der Bakteriophagen im Kalt- oder Warmblüterorganismus lassen sich mit der Hypothese, welche sie zu Ultramikroben stempeln will, schwer vereinen; die Elimination dieser Substanzen aus der Zirkulation erfolgt vielmehr nach den für hochmolekulare Eiweißkolloide (Serumglobuline) ermittelten Gesetzen.

So konvergieren die Resultate der zahlreichen und mannigfaltigen Versuchsanordnungen dieser Kategorie gegen die Schlußfolgerung hin, daß die Ursache der übertragbaren Auflösung der Bakterien kein Lebewesen sein kann, sondern daß es sich um einen von den Bakterien selbst herrührenden, nach der von *Doerr* vertretenen Auffassung von ihnen sezernierten Stoff handelt. *Wie* man sich jedoch den Wirkungsmechanis-

mus dieses Stoffes zu denken hat und zu welchen anderen bereits bekannten Produkten des Anabolismus oder Katabolismus der Zellen er in Beziehung gesetzt werden darf, bleibt trotz der Fülle der in kurzer Frist geleisteten experimentellen Arbeit unentschieden, so daß weitere Untersuchungen über die physikalisch-chemische Beeinflußbarkeit als Beiträge zur Klärung des Problems ihre Rechtfertigung finden.

Die vorliegende Mitteilung befaßt sich mit der *Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration für den Ablauf der übertragbaren Bakteriolyse.*

Fast alle Vorgänge in der belebten und unbelebten Welt sind dem Einflusse der H·-Konzentration unterworfen, oft in hohem Grade; bei der allgemeinen Anerkennung dieser Relation und den gerade in letzter Zeit sehr vervollkommneten Meßmethoden der H-Ionen erscheint es selbstverständlich, daß man bald daran ging zu ermitteln, in welcher Weise die übertragbare Lyse von dem genannten Faktor abhängig ist. Doch sind die in der Bakteriophagenliteratur enthaltenen Angaben über diesen Gegenstand spärlich und nicht widerspruchslos. Sie beschäftigen sich zum Teil mit den extrem hohen und extrem niedrigen H·-Konzentrationen, welche für das lytische Prinzip bei entsprechender Einwirkungsdauer deletär werden. *Eliava* und *Pozerski* verlegen das Intervall, in welchem die lytischen Stoffe ihre charakteristische Aktivität unvermindert beibehalten, zwischen die Wasserstoffexponenten 2,5 und 8,4; niedere oder höhere Werte sollen die Bakteriophagen vernichten. *Watanabe* aber berichtet, daß 10 proz. Sodalösung seinen Flexnerbakteriophagen nur lähme, aber nicht zerstöre, und daß erst 20 proz. Sodalösung denselben sicher „abtöte"; ein Colibakteriophage blieb aber selbst in einer so stark alkalischen Flüssigkeit insofern intakt, als sein Lösungsvermögen beim Kontakt mit dem zugehörigen Colistamm und bei entsprechend geänderter Reaktion erneut hervortrat. Andere Autoren stellten sich die Frage, ob und wie der lytische Prozeß abläuft, wenn man die H·-Konzentration des Milieus (der Bouillon) variiert. So *Gratia*, der zu dem Schlusse kommt, daß leicht saure ($p_H = 7$), ja sogar leicht alkalische Bouillons ($p_H = 7{,}4$) für den lytischen Vorgang bzw. für die durch das lytische Agens bewirkte Behinderung („inhibition") des Bakterienwachstums nicht besonders günstig seien, sondern daß erst stärker alkalische Reaktionen ($p_H = 8{,}0$ bis $8{,}5$) ein Optimum repräsentieren. *Otto* und *Winkler* fanden, daß eine Reaktion vom $p_H = 6{,}5$ zur Gewinnung eines bestimmten Colilysins notwendig war.

Fassen wir alle bisher bekanntgewordenen Einzelheiten zusammen, so können wir sagen: der Stoff, den wir nach Ablauf der Lyse im flüssigen Nährmedium finden und welcher imstande ist, den gleichen Vorgang einzuleiten, wenn er mit lebenden Bakterien desselben Stammes in Kontakt gebracht wird, *besitzt eine beträchtliche Widerstandsfähigkeit*

gegen Säure und Alkali, kann aber seine charakteristische Wirkung nur in einem enge begrenzten Gebiet der Wasserstoffionenkonzentrationen entfalten.

Daraus ergibt sich unmittelbar die Folgerung, daß das Ausbleiben des lytischen Prozesses bei einer bestimmten H·-Konzentration des Milieus verschiedene Ursachen haben kann und daß keineswegs immer eine endgültige Zerstörung des lytischen Agens vorliegt; eine Inaktivierung dieser Substanz z. B. durch Verwandlung in eine reversible, unwirksame Modifikation müßte den gleichen Effekt nach sich ziehen. Damit sind aber noch nicht alle Möglichkeiten erschöpft. Am *d'Hérelle*schen Phänomen beteiligt sich außer dem lytischen Prinzip noch eine zweite Reaktionskomponente, *die Bakterienzelle*, und zwar nur unter ganz bestimmten Bedingungen. Eine „antilytische" H·-Konzentration braucht daher gar nicht auf das lytische Prinzip einzuwirken, sondern kann ebensogut die Bakterien in einem Sinne beeinflussen, welcher den Reaktionsablauf unmöglich macht.

So z. B. ist die Tatsache, daß *tote* Bakterien vom lytischen Prinzip nicht angegriffen werden, heute ausnahmslos anerkannt. *Doerr* und *Grüninger* vermochten sogar zu zeigen, daß abgetötete Mikroben nicht einmal passiv in intensive Lösungsprozesse miteinbezogen werden, die sich im gleichen Reaktionsvolum an lebenden Exemplaren derselben Art abspielen. Das abgestorbene Bacterium ist somit reaktionsunfähig; es löst sich nicht, selbst wenn es von maximalen Lysinkonzentrationen (*H. Meuli*) umspült wird, und daß es an der Lysinproduktion keinen Anteil nimmt, auch nicht durch „autolytischen" Zerfall, darf nach den von *Doerr* und seinen Mitarbeitern erzielten Ergebnissen als gesichert gelten. Bactericide H·-Konzentrationen werden sich also stets als antilytisch erweisen.

Die Bakterien müssen aber nicht nur leben, um in die Reaktion eintreten zu können, sie müssen überdies wachsen und sich vermehren. Die Befunde von *Bordet*, *Doerr*, *Doerr* und *Grüninger*, *Bail*, *Gildemeister* u. a. lassen über die Unerläßlichkeit dieser Bedingung keinen Zweifel aufkommen. Da sich eine demnächst erscheinende Publikation von *Doerr* und *Zdansky* ohnehin mit dieser Frage genauer befassen wird, kann an dieser Stelle auf eine eingehende Erörterung des bisher beigebrachten Beweismaterials verzichtet werden. Ist aber Stoffwechsel und Vermehrung der Bakterien eine conditio sine qua non, dann wird jede entwicklungshemmende H·-Konzentration die Lyse und die Lysinproduktion verhindern oder bremsen.

Schließlich ist es zur Erzielung antilytischer Wirkungen nicht ein mal nötig, daß Stoffwechsel und Vermehrung der Bakterien sistiert oder verlangsamt werden. Es liegt durchaus im Bereiche der Wahrscheinlichkeit, daß die Lebensvorgänge der Mikroben ihre Intensität beibehalten, aber qualitative Veränderungen erfahren. Das geht schon

aus einer analogen Beobachtung von *Doerr* und *Grüninger* über Temperatureinflüsse hervor. Die übertragbare Lyse eines Colistammes nahm von 10—37° C an Geschwindigkeit zu, blieb aber ebenso wie die Lysinvermehrung bei 43° C aus, obwohl sich die Colibakterien bei dieser Temperatur sehr lebhaft und rapide vermehrten, den Traubenzucker fermentativ unter Gasbildung abbauten, also keine Einbuße ihrer „Vitalität" erkennen ließen. Daß Ähnliches auch bei gewissen H·-Konzentrationen einzutreten vermag, wird man zugeben.

Wenn auch dieser Überblick über die a priori konstruierbaren Eventualitäten nicht vollständig genannt werden kann, läßt er doch die *Vieldeutigkeit des antilytischen Einflusses bestimmter H·-Konzentrationen* erkennen. Nicht immer liefert die experimentelle Analyse mit Hilfe der bekannten Methoden die Entscheidung, welche Interpretation als die dem tatsächlichen Geschehen am meisten angenäherte gelten darf. Nur zwei Gruppen von Fällen lassen sich ohne besondere Schwierigkeiten auseinanderhalten. Wenn eine der beiden Reaktionskomponenten zerstört ist, dann wird die Lyse auch nach Wiederherstellung einer optimalen H·-Konzentration nicht in Gang kommen; sind dagegen die Veränderungen, welche Lysin oder Bakterien erlitten haben, reversibel, und gleichen sie sich nach Behebung der abnormen Reaktion spontan aus, so muß die Lyse wieder in Erscheinung treten, sobald das Hindernis beseitigt wird. Dieser Überlegung wurde stets Rechnung getragen.

Alle Versuche wurden mit dem Stamme „Coli sensibel" (*Bordet*) und dem zugehörigen Bakteriophagen ausgeführt. Soweit daher die nachstehenden Angaben quantitativ sind, beziehen sie sich nur auf diese eine Kombination; die abgeleiteten, allgemein formulierten Gesetzmäßigkeiten besitzen aber sicher generelle Gültigkeit. Die Titration der Lysinkonzentrationen erfolgte ausnahmslos nach dem Verfahren von *Appelmans* resp. nach der von *Werthemann* (Arch. f. Hyg. 91, H. 6, 1922) ausgearbeiteten Modifikation; die erhaltenen Werte wurden durch den Lysinexponenten (e_L) ausgedrückt.

Zunächst konnte festgestellt werden, daß das bezeichnete Colilysin innerhalb der durch die Wasserstoffexponenten 4,5 und 5,0 bezeichneten Reaktionsbreite seine Wirksamkeit nicht einbüßt und seine ursprüngliche Konzentration nicht ändert.

1. Versuch.

Fünf Röhrchen enthielten je 9 ccm Bouillon, in welcher eine Lyse von Colibacillen abgelaufen war. Der Inhalt der Eprouvetten war völlig klar, enthielt keine lebenden Colikeime, hatte einen p_H von 7,0 und einen Lysinexponenten von $e_L = 6$; d. h. bei der Auswertung nach *Werthemann* genügten $0{,}9 \times 10^{-6}$ ccm der Flüssigkeit (in 9 ccm Bouillon) gerade noch, um nach Einsaat einer Öse einer 16stündigen Bouillonkultur von „Coli sensibel" komplette Lyse herbeizuführen. Zu vier von den Röhrchen wurde je 0,1 ccm n-HCl zugesetzt, wodurch sich der p_H auf 4,5 erniedrigte; das 5. Röhrchen diente als Kontrolle. Die Eprouvetten

mit dem angesäuerten Inhalt blieben verschieden lange Zeit bei Zimmertemperatur stehen, wurden dann durch Zusatz von 0,1 ccm n-NaOH auf die ursprüngliche H·-Konzentration gebracht und ihr Inhalt auf seinen Lysingehalt geprüft. Die Lysintitrage der Kontrolle erfolgte zugleich mit dem 120 Min. lang angesäuerten Röhrchen.

Dauer der Säureeinwirkung	Lysintiter nach erfolgter Neutralisation
15 Min.	6
30 „	6
60 „	6
120 „	6
Kontrolle (nicht angesäuert!)	6

Bei Zimmertemperatur hatte also die Konzentration des Lysins selbst nach zweistündiger Einwirkung höherer Säuregrade ($p_H = 4{,}5$) nicht abgenommen.

Bei einem zweiten Versuch wurde ein Kölbchen, welches 50 ccm hochkonzentrierten Colilysins ($e_L = 6$) enthielt, an drei aufeinanderfolgenden Tagen jedesmal durch Säurezusatz auf den p_H 4,5 gebracht und durch eine äquivalente Menge Lauge wieder auf die ursprüngliche Reaktion ($p_H = 7{,}0$) zurückgeführt. Das Lysin war der Säureeinwirkung dreimal, im ganzen 17 Stunden exponiert; der Lysinexponent betrug aber schließlich noch immer 5, hatte sich somit nur sehr wenig vermindert.

Anders gestalteten sich die Verhältnisse, wenn die angesäuerten Lysinproben in ein Wasserbad von 56° C eingestellt wurden.

2. Versuch.

Die gleiche Anordnung wie im 1. Versuch. Das verwendete Colilysin hatte den Titer $e_L = 7$, den p_H von 7,01. Durch Säurezusatz erfolgte die Reduktion des p_H auf 4,5; dann kamen die sauren Röhrchen mit einer nicht angesäuerten Kontrolle in ein Wasserbad von 56° C, wurden nach verschiedenen Zeiten herausgenommen, abgekühlt, auf den p_H von 7,01 gebracht und auf ihren Lysingehalt geprüft. Bei der Kontrolle geschah die Bestimmung des Lysintiters erst nach Ablauf der gesamten Versuchsdauer, d. h. nach 2 Stunden.

Dauer der Säureeinwirkung bei 56° C	Lysintiter
15 Min.	—
30 „	1
60 „	—
120 „	0

Es war somit nach 2 Stunden noch etwas Lysin vorhanden, aber nur gerade so viel, daß die konzentrierte Flüssigkeit bei Einsaat 1 Öse Colikultur und nachfolgender Bebrütung klar blieb bzw. klar wurde. Die zehnfache Verdünnung lieferte schon ein negatives Resultat, die Colibakterien konnten sich ungestört entwickeln so wie in einer lysinfreien Bouillon von gleicher Beschaffenheit.

Eine Wiederholung des Versuches ergab sogar im selben Zeitraume die völlige Zerstörung des Lysins, insofern als die angesäuerte, 2 Stunden

auf 56° C erwärmte und neutralisierte Probe auch im konzentrierten (unverdünnten) Zustande die eingesäten Colibakterien nicht mehr zur Lysinproduktion anzuregen vermochte; die Colikeime wuchsen im gleichen Tempo und in derselben Üppigkeit wie im lysinfreien Milieu und die durch Lyse bedingte (oft nachträglich noch eintretende) Aufhellung blieb ganz aus.

Die Titrage der angesäuerten und wieder neutralisierten Lysinproben nach der Methode von *Werthemann* bot natürlich nur einen direkten Aufschluß über die *quantitative Reduktion des Lysins* (ausgedrückt durch die Abnahme seiner Verdünnbarkeit bis zur Wirksamkeitsgrenze). Über *qualitative*, durch die Säureeinwirkung zustande gekommene Veränderungen gestattet sie an sich keine Aussage. Wir sind dieser letzterwähnten Frage nicht weiter nachgegangen und begnügen uns mit einer anscheinend sehr wichtigen Feststellung. *Das durch Säure reduzierte resp. nach Säureeinwirkung noch nachweisbare Lysin verhält sich genau so wie die ursprüngliche Substanz in der entsprechenden Verdünnung.* Es folgt dem von *H. Meuli* aufgestellten Gesetz, demzufolge die terminale Lysinkonzentration eine von der initialen Lysinkonzentration unabhängige Konstante repräsentiert.

3. Versuch.

Ein Colilysin vom Titer $e_L = 7$ wird bis zum $p_H = 4{,}5$ angesäuert, 30 Min. auf 56° C im Wasserbade erwärmt und schließlich wieder neutralisiert, so daß der Wasserstoffexponent den Ausgangswert (7,0) annimmt. Nun wird die *Werthemann*sche Verdünnungsreihe mit Bouillon hergestellt, derart, daß in je 9 ccm Bouillon fallende Mengen des angesäuerten und neutralisierten Lysins enthalten sind; alle Röhrchen werden mit je 1 Öse 16stündiger Bouillonkultur des Stammes „Coli sensibel" beimpft und bei 37° C gehalten, bis sich die Grenze zwischen den klaren und den trüb gewordenen Röhrchen nicht mehr verschiebt. Das Ergebnis wird sodann abgelesen und verzeichnet, wobei θ Lyse, + ungestörtes Bakterienwachstum bedeutet.

Nr. des Röhrchens	Gehalt an angesäuertem Lysin	Resultat
1.	$0{,}9 \times 10^{+1}$	θ
2.	$0{,}9 \times 10^{0}$	θ
3.	$0{,}9 \times 10^{-1}$	θ
4.	$0{,}9 \times 10^{-2}$	+
5.	$0{,}9 \times 10^{-3}$	+

Der Titer des angesäuerten Lysins beläuft sich somit nur mehr auf $e_L = -1$ gegen $e_L = -6$ des intakt gebliebenen.

Nun wird der Inhalt der Röhrchen 1, 2 und 3 nach *Werthemann* auf Lysin geprüft und überall der Lysinexponent — 6 erhalten, d. h. es tritt Lyse noch in den Röhrchen ein, welche nur $0{,}9 \times 10^{-6}$ ccm des Inhaltes der Röhrchen 1, 2 oder 3 enthalten. Das angesäuert gewesene und quantitativ reduzierte Lysin war somit imstande, ein ganz ebenso starke Neubildung von Lysin auszulösen, wie irgendeine Verdünnung der ursprünglichen Lysinlösung.

Nachdem in dieser Weise konstatiert worden war, daß die angegebene H·-Konzentration ($p_H = 4{,}5$) das lytische Prinzip bei 37° C überhaupt

nicht angreift, und daß erst bei 57° C eine Veränderung, und zwar eine anscheinend rein quantitative Reduktion stattfindet, sollten die Beziehungen zwischen $H^{\cdot}$-Konzentration und Reaktionsablauf untersucht werden. Zu diesem Behufe wurde folgender Versuch angesetzt:

4. Versuch.

Ein Colilysin wurde in 2 Parallelreihen nach *Werthemann* in Potenzen von 10 fortschreitend verdünnt. Als Verdünnungsflüssigkeit diente in der 1. Reihe eine Bouillon vom $p_H = 7{,}2$, in der 2. eine solche vom $p_H = 4{,}84$. Hierauf wurden sämtliche Röhrchen beider Reihen mit je 1 Öse einer 16stündigen Bouillonkultur von „Coli sensibel" beimpft und bei 37° C bis zur Stabilisierung der Grenze der klaren gegen die trüben Röhrchen gehalten.

In der „alkalischen" Reihe waren nach 10stündiger Bebrütung die ersten 9 Röhrchen klar, während die folgenden den gleichen Trübungsgrad wie ein Kontrollröhrchen ohne Lysin zeigten. Der Lysinexponent betrug daher — 8 ($e_L = 8$).

In der „sauren" Reihe dagegen war in allen Röhrchen ein mäßiges, agglutiniertes Wachstum (Säureagglutination) eingetreten, genau so wie in dem zugehörigen Kontrollröhrchen.

Nr. des Röhrchens	Menge des Ausgangslysins	Ergebnis der Bebrütung bei $p_H = 7{,}2$	Ergebnis der Bebrütung bei $p_H = 4{,}84$
1.	$0{,}9 \times 10^{0}$ ccm	θ	+ a
2.	$0{,}9 \times 10^{-1}$ „	θ	+ a
3.	$0{,}9 \times 10^{-2}$ „	θ	+ a
4.	$0{,}9 \times 10^{-3}$ „	θ	+ a
5.	$0{,}9 \times 10^{-4}$ „	θ	+ a
6.	$0{,}9 \times 10^{-5}$ „	θ	+ a
7.	$0{,}9 \times 10^{-6}$ „	θ	+ a
8.	$0{,}9 \times 10^{-7}$ „	θ	+ a
9.	$0{,}9 \times 10^{-8}$ „	θ	+ a
10.	$0{,}9 \times 10^{-9}$ „	+	+ a
11.	$0{,}9 \times 10^{-10}$ „	+	+ a
12.	$0{,}9 \times 10^{-11}$ „	+	+ a
Kontrolle	θ	+	+ a

Das Wachstum in der sauren Reihe erfolgte demnach so, als ob überhaupt kein Lysin vorhanden gewesen wäre.

Aus den Arbeiten von *Doerr*, *Doerr* und *Grüninger* sowie *H. Meuli* geht hervor, daß es erst dann zum Absterben der Bakterien und zur Lyse kommt, wenn das lytische Prinzip einen ganz bestimmten, für jede Spezialkombination von Bakterien und Bakteriophagen charakteristischen Konzentrationswert erreicht hat. Es muß also jeder Lyse, wenn sie nicht gerade durch Bakterieneinsaat in ein bereits maximal konzentriertes Lysin eingeleitet wird, eine Lysinneubildung vorausgehen, deren Ausmaß vorausberechnet werden kann, wenn man die initiale Lysinkonzentration kennt.

Wendet man dieses Gesetz auf den geschilderten Versuch an, so kann man mit Sicherheit behaupten, daß die ersten 9 Röhrchen der alkalischen Reihe ($p_H = 7{,}2$) den eben präzisierten Bedingungen entsprechen und daß jedes von ihnen nach Ablauf der Lyse so viel lytisches Prinzip

enthielt, daß die Wirkungsgrenze durch eine milliardenfache Verdünnung gerade erreicht wurde.

Wenn aber in *keinem* Röhrchen der sauren Reihe ($p_H = 4{,}84$) Lyse eintrat, so konnte das daran liegen, daß die hohe H·-Konzentration die Neubildung von Lysin verhinderte. Die Richtigkeit dieser Vermutung war aber jedenfalls erst zu erweisen. Nach *Doerr* und *Berger* kommt es auch in Agar oder in (flüssiger) Gelatine nicht zur Lyse; aber die Lysinproduktion ist dabei keineswegs gehemmt, sie vollzieht sich im gleichen Ausmaße wie in leicht alkalischer Nährbouillon. Die Lysinvermehrung ist also — mathematisch gesprochen — eine notwendige, aber keineswegs hinreichende Bedingung der Bakterienauflösung.

Um zu erfahren, wie die Verhältnisse in unserem Falle liegen, war es also nötig, die Lysinkonzentration in den einzelnen Röhrchen der sauren Reihe zu bestimmen, natürlich erst nach vorausgegangener Abstumpfung der Säure, was durch Zusatz von je 0,1 ccm n-NaOH geschah; der p_H belief sich sodann auf 7,3. Hierauf wurden die Röhrchen zwecks Abtötung der in ihnen enthaltenen Colikeime 45 Minuten auf 56° C erhitzt und schließlich die Lysintitration des Inhalts nach *Werthemann* (mit gewöhnlicher Nährbouillon als Verdünnungsflüssigkeit, $p_H = 7{,}3$) in der üblichen Art vorgenommen. Zwecks Materialersparnis beschränkten sich diese Titrationen auf die Röhrchen 1, 3, 5, 7, 9 und 11 der sauren Reihe.

Das Ergebnis der Auswertungen kann der nachstehenden Tabelle leicht entnommen werden. In den zwei ersten horizontalen Zeilen wurden die „alkalische" und die „saure" Verdünnungsreihe nochmals angeschrieben; die Vertikalkolumnen stellen die Resultate der Titration der einzelnen Röhrchen der „sauren" Reihe dar.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
$p_H = 7{,}2$	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	+	+
$p_H = 4{,}84$	+ a	+ a	+ a	+ a	+ a	+ a	+ a	+ a	+ a	+ a	+ a
	↓		↓		↓		↓		↓		↓
1.	θ		θ		θ		θ		+		+
2.	θ		θ		θ		θ		+		+
3.	θ		θ		θ		–		–		–
4.	θ		θ		+		+		+		+
5.	θ		θ		+		+		+		+
6.	θ		θ		+		+		+		+
7.	θ		+		+		+		+		+
8.	θ		+		+		+		+		+
9.	+		+		+		+		+		+
10.	+		+		+		+		+		+
11.	+		+		+		+		+		+

In keinem der Röhrchen der sauren Reihe war es sonach zu einer Lysinvermehrung gekommen; vielmehr fand sich — wenn man von der unbedeutenden, innerhalb der Fehlergrenzen des Titrationsverfahrens liegenden Abweichung bei Röhrchen Nr. 5 absieht — in jeder Eprouvette geradesoviel Lysin vor, als man rechnungsgemäß nach dem Verdünnungsgrade erwarten durfte. Eine Gegenüberstellung der berechneten und gefundenen Werte für die Lysinexponenten illustriert das sehr deutlich:

	e_L berechnet	e_L gefunden
Röhrchen 1	7	7
„ 3	5	5
„ 5	3	2
„ 7	1	1

Lytisches Prinzip und sensible Bakterien koexistieren somit bei einer H·-Konzentration, welche dem p_H 4,5 *entspricht, anscheinend ohne sich gegenseitig zu beeinflussen.* Wenigstens konstatiert man, daß die Mikroben auch bei sehr hohen Lysinkonzentrationen ein ungestörtes, nur durch die saure Reaktion modifiziertes (agglutiniertes) Wachstum zeigen.

Man muß aber berücksichtigen, daß die Genauigkeit der Lysintitration nach *Appelmans-Werthemann* immerhin begrenzt ist schon durch den Umstand, daß die Verdünnungen fortschreitend in Potenzen von 10 angelegt werden. Die Zwischenwerte bestimmt man bei dieser Methode überhaupt nicht, und es liegt daher im Bereiche der Möglichkeit, daß Lysinabnahmen, welche nur einige Prozente einer vorhandenen Konzentration betragen, de facto vor sich gehen, ohne in den ermittelten Endziffern zum Ausdrucke zu kommen. Tritt jedoch eine solche Abnahme beim Wachstum der Bakterien im sauren Milieu ein, dann dürfen wir offenbar nicht mehr behaupten, daß wachsende Bakterien und lytisches Prinzip reaktionslos nebeneinander verharren. Diese Aussage wäre aber auch dann gewagt, wenn wir jeden auch noch so kleinen Lysinverbrauch ausschließen könnten. Wir wissen zur Zeit nicht, auf welche Art das die Bakterien umspülende gelöste Lysin die Mikrobenzellen beeinflußt und sind daher gar nicht in der Lage, aus dem fehlenden Lysinverbrauch zu folgern, daß eine solche Beeinflussung nicht stattgefunden haben kann. Die Vorstellung, daß das extracelluläre Lysin in die Bakterien eindringen muß, um die bekannten, mit der Auflösung endigenden Vorgänge auszulösen, stammt bekanntlich von *d'Hérelle*, zu dessen Theorie vom obligaten Zellparasiten sie vortrefflich paßte. Die anderen Autoren haben sie von *d'Hérelle* übernommen, zum Teile ohne zu bedenken, daß das lytische Agens nachgewiesenermaßen hochmolekular ist und die Bakterienmembran nicht ohne weiteres passieren kann.

Doch erscheint es gar nicht notwendig, das Fehlen oder Vorhandensein eines Reaktionsgeschehens gerade aus den quantitativen Lysin-

schwankungen abzuleiten. Vielmehr ist es zweckmäßiger, die Bakterien als Indicator heranzuziehen, welche durch die Lysineinwirkung verschiedene, leicht konstatierbare und auf ihre Nachkommen vererbbare Eigenschaften annehmen: die Lysoresistenz und die Lysogenität.

Um darüber Klarheit zu bekommen, wie sich die Bakterien nach längerem Wachstum in saurem lysinhaltigen Milieu verhalten, wurde in folgender Weise vorgegangen:

5. Versuch.

Ein Colilysin vom Titer $e_L = 9$ wurde in Potenzen von 10 mit saurer Bouillon ($p_H = 4{,}5$) fortschreitend verdünnt; die Eprouvetten wurden mit je 1 Öse 16stündiger Colibouillonkultur beimpft und 48 Stunden bei 37° C bebrütet. Nach Ablauf dieser Zeit war in allen Röhrchen reichliches agglutiniertes Wachstum eingetreten.

Nun wurde das 7. Röhrchen der Reihe, welches rechnungsgemäß den Lysinexponenten (e_L) 1 haben mußte, also nur noch sehr geringe Mengen des lytischen Prinzips enthielt, herausgenommen, scharf auszentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit abgehebert und durch saure Bouillon von derselben H·-Konzentration ersetzt. Das Bakteriensediment wurde aufgewirbelt und neuerlich zentrifugiert usw. Nach dreimaliger Wiederholung dieser Waschprozedur in saurer Bouillon (mit beständigem Wechsel der Zentrifugengläser und Pipetten!) wurde von den gewaschenen Bakterien soviel in alkalische Bouillon eingetragen, daß eine deutliche Trübung entstand, eine Öse konzentriertes Colilysin hinzugefügt und bebrütet.

Je nach der Menge der ausgesäten Bakterien war das Resultat verschieden. War die Aussaat gering genug, so trat überhaupt keine Trübung der Bouillon ein. War dagegen die eingetragene Bakterienmenge relativ groß, so erfolgten Lyse und Aufhellung erst nach vorausgegangener, durch Bakterienwachstum bedingter Trübung. *Die in saurem Lysin gewachsenen Colikeime resp. ihre Nachkommen erwiesen sich also jedenfalls nicht als lysoresistent.*

Wurden aber die gewachsenen Bakterien in Bouillon ohne Lysinzusatz übertragen, so erfolgte auch hier eine Lysinproduktion in maximalem Ausmaße, an die sich eine Lyse anschloß. Es hatte somit zunächst den Anschein, als ob die Keime aus sich heraus Lysin gebildet hätten, als ob sie unter dem Einfluß des Lysins im sauren Milieu lysinogen geworden wären.

Eine andere Versuchsanordnung belehrte uns jedoch, daß dem nicht so sei und daß die vorgetäuschte Lysogenität auf der schon von *Bordet* betonten praktischen Unmöglichkeit beruhen müsse, Lysin von lysablen Bakterien „wegzuwaschen". Selbst die angewendeten Kautelen (ständiger Wechsel der Gefäße und Pipetten) hatten nicht ausgereicht, um die letzten, noch wirksamen Lysinspuren zu entfernen.

Erst die Methode der fortschreitenden Verdünnung führte auch hier zu einwandfreien Ergebnissen.

6. Versuch.

Ein Colilysin ($e_L = 9$) wurde mit saurer Bouillon in Potenzen von 10 fortschreitend verdünnt, die Röhrchen mit „Coli sensibel" beimpft und bei 37° C 48 Stunden bebrütet, bis ziemlich üppiges agglutiniertes Wachstum zu sehen war.

Hierauf wurde vom 7. Röhrchen der Reihe ausgehend in Potenzen von 10 abermals mit saurer Bouillon verdünnt, bis die Lysinkonzentration dem 10. bzw. 11. bzw. 12. der 1. Reihe entsprach, also so gering geworden war, daß sie auch bei optimaler $H^{\cdot}$-Konzentration nicht ausgereicht hätte, um die Lyse in Gang zu bringen. Gleichzeitig mit dem Lysin des 7. Röhrchens erfuhren aber natürlich auch die in demselben suspendierten Colikeime eine 1000, 10 000 und 100 000fache Verdünnung resp. Abnahme ihrer Zahl. Hätten nun diese Keime durch das vorherige Wachstum im sauren Lysin die hereditäre Lysogenität erworben, so mußte die letztere bei der Aussaat auf Agar (Flatterform der Kolonien) oder in Bouillon (nachweisbare Lysinproduktion) zum Vorschein kommen. Das Verfahren lief also darauf hinaus, das extracelluläre Lysin durch Verdünnungsgrade zu eliminieren, welche den Gehalt der betreffenden Probe an in saurem Lysin gewachsenen Colikeimen nicht auf Null reduzierten.

Unter diesen Bedingungen wuchsen nun die aus dem sauren Lysin stammenden Colibakterien auf Agar nur in völlig typischen regelmäßigen Kolonien, und die abgeimpften Stämme erwiesen sich als mit dem Ausgangsstamm in jeder Hinsicht identisch; sie waren also sensibel, nicht resistent und nicht lysogen.

Überimpft man aus den Röhrchen einer mit saurer Bouillon angelegten Verdünnungsreihe eines Colilysins, in denen sich Colibakterien entwickelt haben, auf alkalische Bouillon, so kann man Ähnliches feststellen. Lyse erfolgt nur, wenn mit den Bakterien so viel extracelluläres Lysin mit übertragen wird als zur Einleitung des Reaktionsablaufes an sich genügt; andernfalls tritt die Lyse erst dann ein, wenn man frisches Colilysin in ausreichender Menge zusetzt.

Damit ist nunmehr festgestellt, daß Lysin und sensible Bakterien bei saurer Reaktion nebeneinander bestehen können, ohne miteinander in irgendeine Beziehung zu treten; das Lysin bleibt quantitativ und qualitativ unverändert, die Bakterien wachsen ungestört und nehmen keine neuen Eigenschaften an.

Die hier wiedergegebenen Versuche lassen erkennen, in welch mannigfaltiger Weise ein und derselbe Faktor einen komplexen Vorgang, wie ihn das Phänomen von *d'Hérelle* repräsentiert, beeinflussen kann. Abgesehen davon, daß jede der beiden Reaktionskomponenten für sich gegen hohe $H^{\cdot}$-Konzentrationen empfindlich ist, wird auch der Reaktionsablauf durch ein Übergewicht der $H^{\cdot}$-Ionen über die $OH^{\cdot}$-Ionen weitgehend bestimmt. Die Bakteriophagenreaktion kann durch eine entsprechende Änderung der $H^{\cdot}$-Konzentration sofort sistiert werden, auch wenn diese Änderung dem Grade nach zu gering ist, um das lytische Prinzip zu schädigen oder die Bakterien ihrer Lebens- und Vermehrungsfähigkeit zu berauben. Derartige Erhöhungen der $H^{\cdot}$-Konzentration

müssen nicht gerade willkürlich durch Zusatz von Säure herbeigeführt werden, sondern können sich auch automatisch aus dem Stoffwechsel der Bakterien (Acidifikation durch fermentative Spaltung von Kohlenhydraten) ergeben. In Übereinstimmung mit *Otto* und *Winkler* fanden wir, daß der Grenzwert des Wasserstoffexponenten, unterhalb dessen es nicht mehr zur Lysinproduktion und daher auch nicht mehr zur Lyse kommt, bei 6,5 liegt, eine H·-Konzentration, welche noch ein üppiges Wachstum der Colikeime gestattet und das lytische Prinzip selbst bei protrahierter Einwirkung nicht angreift.

Auch andere Fragestellungen und Experimente, welche das *d'Hérelle*sche Phänomen betreffen, werden in Hinkunft auf diese Verhältnisse Bedacht nehmen und jede der beiden Reaktionskomponenten sowie auch den Reaktionsablauf gesondert ins Auge fassen müssen; viele der in der Literatur vorliegenden Angaben über die Resistenz, über gelungene Anpassungen und Spezifitätsänderungen des lytischen Prinzips verlieren ihre Bedeutung, weil sie diese Forderung nicht befriedigen.

Um jedoch derartige analytische Untersuchungen komplexer biologischer Prozesse durchführen zu können, benötigt man in erster Linie zuverlässige quantitative Methoden. Für die Bakteriophagenreaktion stehen sie uns zur Verfügung. Die von *Doerr* und *Berger* nachgewiesene Tatsache, daß die Einsaat in Gelatine oder Nähragar die Bakteriophagenreaktion storniert, gestattet es uns, die Zahl der in jedem Momente des Reaktionsablaufes vorhandenen, noch vermehrungsfähigen Mikroben zu ermitteln. Für die Messung des lytischen Prinzips andererseits eignet sich das von *Appelmans-Werthemann* angegebene Verfahren der fortschreitenden Verdünnung, welches uns mit großer Genauigkeit über die geringste Menge (Konzentration) dieses Stoffes unterrichtet, die eben noch imstande ist, die Bakteriophagenreaktion unter bestimmten reproduzierbaren Bedingungen in Gang zu bringen. Zahlreiche Prüfungen haben uns überzeugt, daß das genannte Verfahren den diversen Plattenmethoden überlegen ist; in der Bouillon gelangen noch Lysinkonzentrationen zu voller, ohne weiteres feststellbarer Auswirkung, welche auf der Platte keinen wahrnehmbaren Effekt hervorrufen oder so geringgradige Wirkungen erzeugen, daß sie leicht übersehen werden können.

Zusammenfassung.

1. Eine H·-Konzentration, welche dem p_H von 4,5 entspricht, schädigt das lytische Agens selbst bei mehrstündiger Einwirkung nicht, wenn die Temperatur 20—37° C beträgt.

2. Die gleiche H·-Konzentration zerstört das lytische Agens bei 56° C in 2 Stunden vollständig oder fast vollständig; eine kürzere Einwirkungsdauer hat eine rein quantitative Abnahme des Lysins zur Folge, welche sich bei den angewendeten Untersuchungsmethoden als

gleichwertig mit einer entsprechenden Verdünnung erwies. Anhaltspunkte für qualitative Veränderungen konnten nicht gewonnen werden.

3. Bei 37° C entwickelt sich Bacterium coli in saurer und lysinhaltiger Bouillon ($p_H = 4{,}5$, $e_L = 7$) ungestört. Das lytische Prinzip erfährt dabei weder eine Vermehrung noch eine Verminderung, und die Bakterien nehmen keine neuen, erblich fixierten Eigenschaften (Lysinresistenz oder Lysogenität) an. Unter den angegebenen Bedingungen sind somit die Komponenten der Bakteriophagenreaktion (lytisches Prinzip und wachsende Bakterien) vorhanden, aber die Reaktion (Lysinvermehrung und Bakteriolyse) findet nicht statt.

4. Die Herstellung einer neutralen bis schwach alkalischen Reaktion bringt das Bakteriophagenphänomen, welches in saurer und lysinhaltiger Bouillon gehemmt war, sofort in Gang. Es bleibt derzeit unentschieden, ob das lytische Prinzip durch höhere Säuregrade in unwirksame, salzartige, reversible Verbindungen übergeführt wird (wie manche Bakterientoxine nach *Doerr*) oder ob die extremen H·-Ionenkonzentrationen die Bakterienoberflächen so verändern, daß das lytische Agens nicht einwirken kann.

5. Die Beeinflußbarkeit des *d'Hérelle*schen Phänomens durch höhere H·-Konzentrationen in dem die Bakterien umspülenden Milieu, insbesondere aber die Möglichkeit, diesen Einfluß durch Beseitigung des H·-Übergewichtes wieder zu annullieren, sprechen für die unbelebte Natur des lytischen Prinzips.

Literaturverzeichnis.

Appelmans, Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **85**, 722. 1921. — *Bail*, Wien. klin. Wochenschr. **2**[1], 237. 1921. — *Bordet* und *Ciuca*, Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **83**, 1293. 1920. — *Doerr*, Klin. Wochenschr. 1922, Heft 30 und 31. — *Doerr* und *Berger*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **97**, Heft 1 und 2. — *Doerr* und *Grüninger*, Schweiz. med. Wochenschr. **31**, 761. 1922. — *Eliava* und *Pozerski*, Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **84**, 708. 1921; **85**. 139. 1921. — *Gratia*, Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **84**, 275. 1921. — *Gratia*, Proc. of the soc. f. exp. biol. a. med. **18**, 192. 1921. — *Gratia*, Journ. of exp. med. **34**. 115. 1921. — *Hauduroy*, Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **87**. 1089. 1922. — *d'Hérelle*, Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **83**, 1320. 1920. — *d'Hérelle*, Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **85**, 767. 1921. — *d'Hérelle* und *Pozerski*, Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **85**, 1011. 1921. — *Kuttner*, Proc. of the soc. f. exp. biol. a. med. **18**, 158. 1921. — *Kuttner*, Journ. of bacteriol. **8**, Heft 1. 1923. — *Kabéshima*, Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **83**, 219. 1920. — *Kabéshima*, Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **83**, 471. 1920. — *McLead* und *Govenlock*, Lancet **1**, 900. 1921. — *Meuli*, Arch. f. Hyg. **99**. 1923. — *de Necker*, Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **86**, 736. 1922. — *Otto* und *Munter*, Dtsch. med. Wochenschr. **52**, 1579. 1921. — *Otto* und *Winkler*, Dtsch. med. Wochenschr. 1922, S. 383. — *Poorter* und *Maisin*, Arch. internat. de pharmaco-dyn. et de thérapie **25**, 473. 1921. — *Prausnitz*, Klin. Wochenschr. **33**, 1639. 1922. — *Watanabe*, Wien. klin. Wochenschr. **43**, 522. 1921. — *Werthemann*, Arch. f. Hyg. **91**, Heft 6. 1922.